

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2005 年 6 月 9 日 (09.06.2005)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 2005/051982 A1

(51) 国際特許分類: C07K 7/06, A61K 47/42

Kazukiyo) [JP/JP]; 〒4640814 愛知県名古屋市千種区不老町 名古屋大学大学院工学研究科 Aichi (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP2004/007246

(22) 国際出願日: 2004 年 5 月 27 日 (27.05.2004)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:  
特願 2003-400817  
2003 年 11 月 28 日 (28.11.2003) JP

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 東亜合成株式会社 (TOAGOSEI CO., LTD.) [JP/JP]; 〒1058419 東京都港区西新橋 1 丁目 1 4 番 1 号 Tokyo (JP).

(72) 発明者; および

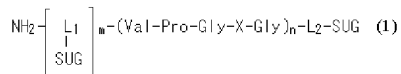
(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 三浦 佳子 (MIURA, Keiko) [JP/JP]; 〒4640814 愛知県名古屋市千種区不老町 名古屋大学大学院工学研究科 Aichi (JP). 柴田 千絵理 (SHIBATA, Chieri) [JP/JP]; 〒4640814 愛知県名古屋市千種区不老町 名古屋大学大学院工学研究科 Aichi (JP). 小林一清 (KOBAYASHI,

添付公開書類:  
— 国際調査報告書

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: GLYCOPEPTIDES AND TEMPERATURE-RESPONSIVE MICELLES

(54) 発明の名称: 糖ペプチド及び温度応答性ミセル



glycopeptide. [Chemical formula 1] (1) wherein X represents an arbitrary amino acid residue; L<sub>1</sub> and L<sub>2</sub> represent each a linker; SUG represents a sugar chain; m is 0 or 1; and n is an integer of from 1 to 10, provided that L<sub>1</sub> and L<sub>2</sub> may be either the same or different from each other and a plural number of SUGs may be either the same or different from each other.

(57) Abstract: It is intended to provide temperature-responsive amphiphilic glycopeptides and temperature-responsive micelles. Namely, a glycopeptide which would not occur in nature and is represented by the following general formula (1) and a temperature-responsive micelle comprising the

(57) 要約: オリゴペプチドを用いて、温度応答性を有する両親媒性の糖ペプチド及び温度応答性ミセルを提供する。天然には存在しない合成された糖ペプチドであって、下式 (1) で表される糖ペプチド及び該糖ペプチドからなる温度応答性ミセル。【化 1】 (上式において X は任意のアミノ酸残基であり、L<sub>1</sub> 及び L<sub>2</sub> はリンカーであり、SUG は糖鎖であり、m は 0 又は 1 であり、n は 1 ~ 10 の整数であり、L<sub>1</sub> 及び L<sub>2</sub> は互いに同じであっても異なってもよく、複数の SUG は互いに同じであっても異なっても良い。)

WO 2005/051982 A1

## 明 細 書

### 糖ペプチド及び温度応答性ミセル

### 技術分野

- [0001] 本発明は温度応答型の両親媒性化合物である糖ペプチド及びこの糖ペプチドからなる温度応答性ミセルに関するものである。さらに詳しくは、薬物送達システム(DDS)のための新しい製剤やマイクロリアクターにおいて有用な糖ペプチド及びミセルに関する。

### 背景技術

- [0002] これまでの温度応答型の両親媒性化合物は主にポリN-イソプロピルアクリルアミド、ポリN,N-ジエチルアクリルアミドを利用したポリマーが殆どであった(例えば、Macromolecules, 1998, 31, 2394. J. Am Chem. Soc. 1996, 118, 6092.)。これらの化合物と水溶性高分子のブロック共重合体は温度応答性の界面活性剤として機能することが知られている。しかし、これらの化合物のブロック重合体を得ることは容易ではない。また、これらの高分子化合物においては、オンGSTROOMレベルでの重合度の制御は容易ではない。
- [0003] また、従来の温度応答型の高分子のモノマーは生体毒性の高い、アクリルアミドなどであり、ビニル化合物を用いることなく、温度応答性物質を開発することが望まれている。
- [0004] 生体安全性の高い、温度応答物質として、細胞外マトリックスであるエラスチンのモデルシーケンスを利用した高分子物質の合成が考えられている。これまでにVal-Pro-Gly-Val-GlyやGly-Val-Pro-Gly-Val-Glyなどの繰り返しシーケンスを有するアミノ酸の多量体が温度応答性の高分子として機能することが示されている(例えばMacromolecules, 1999, 32, 9067. Biomacromolecules, 2000, 1, 552.)。また、エラスチンモデルシーケンスの第4残基を変更したペプチドも温度応答性を示すことがこれまでに報告されている(J.Phys. Chem. B, 1997, 101, 11007)。

しかし、この高分子物質ではポリN-イソプロピルアクリルアミドなどのビニル系の温度応答性高分子と同様に、オンGSTROOMレベルでの制御された化合物は実現し

ていなかった。

非特許文献1:Macromolecules, 1998, 31, 2394

非特許文献2:J. Am Chem. Soc. 1996, 118, 6092

非特許文献3:Macromolecules, 1999, 32, 9067

非特許文献4:Biomacromolecules, 2000, 1, 552

非特許文献5:J.Phys. Chem. B, 1997, 101, 11007

## 発明の開示

### 発明が解決しようとする課題

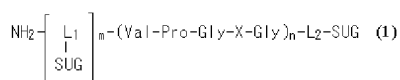
- [0005] 本発明は上記事情に鑑み、オリゴペプチドを用いて、温度応答性を有する両親媒性の糖ペプチドを提供しようとするものである。特に、本発明は、生体親和性の高い温度応答性のオングストロームレベルの化合物を提供し、医療材料、薬物輸送、農業などに役に立つ化合物にすることを目的とする。

### 課題を解決するための手段

- [0006] 本発明は、温度応答的に親水性と疎水性が変化するエラスチンモデルペプチド(−(Val-Pro-Gly-Val-Gly)<sub>n</sub>−)と親水性の糖鎖を組み合わせた糖ペプチドが特異な温度応答性を有することを見出し、完成されたものである。

即ち、本発明は、天然には存在しない合成された糖ペプチドであって、下式(1)で表される糖ペプチド及び該糖ペプチドからなる温度応答性ミセルである。

- [0007] [化1]



- [0008] (上式においてXは任意のアミノ酸残基であり、L<sub>1</sub>及びL<sub>2</sub>はリンカーであり、SUGは糖鎖であり、mは0又は1であり、nは1〜10の整数であり、L<sub>1</sub>及びL<sub>2</sub>は互いに同じであっても異なってもよく、複数のSUGは互いに同じであっても異なっても良い。)

### 発明の効果

[0009] 本発明の糖ペプチドは可逆的かつ、迅速な温度応答性を有し、本発明の糖ペプチドからなるミセルはある温度領域で粒径が変化するという温度応答性を有する。

本発明の糖ペプチドはオングストロームレベルの温度応答性分子であり、精密な応答性を要する薬物送達システムやその他の分子デバイスに用いられる。

更に、本発明の糖ペプチドは生体親和性の高い分子構造によって構成されており、生体材料や農業用材料に適した化合物である。

更に、糖は細胞、病原菌、毒素、ウイルスと特異的な相互作用することが知られており、本発明の糖ペプチドは温度応答的に病原体を抑制する薬剤へとより有利に用いられることとなるのである。

#### 図面の簡単な説明

[0010] [図1]化合物1、化合物4及び化合物8の合成フローを示す図である。

[図2]化合物1のCDスペクトルを示す図(波長とMolecular ellipticityとの関係図)である。

[図3]化合物1のCDスペクトルを示す図(温度とMolecular ellipticityとの関係図)である。

[図4]化合物4のCDスペクトルを示す図(波長とMolecular ellipticityとの関係図)である。

[図5]化合物4のCDスペクトルを示す図(温度とMolecular ellipticityとの関係図)である。

[図6]化合物8のCDスペクトルを示す図(波長とMolecular ellipticityとの関係図)である。

[図7]化合物8のCDスペクトルを示す図(温度とMolecular ellipticityとの関係図)である。

[図8]対照化合物(NH<sub>2</sub>-Val-Pro-Gly-Val-Gly-Val-Pro-Gly-Val-Gly-OH)のCDスペクトルを示す図(波長とMolecular ellipticityとの関係図)である。

[図9]対照化合物(NH<sub>2</sub>-Val-Pro-Gly-Val-Gly-Val-Pro-Gly-Val-Gly-OH)のCDスペクトルを示す図(温度とMolecular ellipticityとの関係図)である。

[図10]化合物1、4、8のDLS測定結果を示す図である。

[図11]化合物1からなるミセルの温度応答性を示す図である。

[図12]化合物1の気液界面の  $\pi$ -A 曲線 (圧力-面積曲線) の図である。

### 発明を実施するための最良の形態

#### [0011] ○糖鎖

本発明の糖ペプチドに用いることができる好ましい糖鎖は、単糖又はオリゴ糖の糖鎖であり、より好ましくは3糖以下の糖鎖である。

単糖の好ましい例として、マンノース、 $\alpha$ 、 $\beta$ -グルコース、ガラクトース、フコース、シアル酸、グルコサミン、N-アセチルグルコサミン及びN-アセチルガラクトサミン等がある。

オリゴ糖の好ましい例として、マルトース、セロビオース、ラクトース、イソマルトース、キトビオース、キトリオース、セロトリオース、マルトリオース、セロテトラオース、キトテトラオース、セロペンタオース、マルトテトラオース、マルトペンタオース、キトペンタオース、セロヘキサオース、キトヘキサオース等がある。

本発明の糖ペプチドにおいて糖鎖は親水性基を構成するものであり、ペプチドが温度応答により凝集した際、糖ペプチドを両親媒性とするために、エラスチンモデルペプチドの親・疎水性を考慮して、糖が適宜選択される。

#### [0012] ○リンカー

本発明にあたっては、ペプチドと糖鎖のリンカーは、ペプチドと糖鎖を結合する有機基を有するものであれば、制限はない。

C末端側の好ましいリンカー $L_2$ として、パラアミドフェノキシド、アルキルアミン及びエチレングリコールアミンなどがある。

上式(1)において $L_1$ は、ペプチド鎖のN末端側に糖鎖を結合させるためのリンカーであり、好ましくはグルタミン酸、アスパラギン酸等のカルボキシル基を有するアミノ酸をペプチド鎖に組み込むことにより、C末端側のリンカー $L_2$ と同様のリンカーを更に結合させることにより糖鎖を容易に結合することができる。

#### [0013] ○ペプチド

本発明におけるペプチドは、エラスチンモデルペプチドのオリゴペプチドである(Val-Pro-Gly-X-Gly) $_n$ 又は(Glu-Val-Pro-Gly-X-Gly) $_n$ (但し、Xは任意のアミノ酸残

基であり、nは1～10の整数である。)のシーケンスを有するものである。

好ましいペプチドにおいて、前記シーケンスにおけるXはValである。

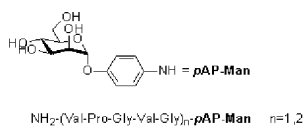
糖に単糖を用いる場合については、迅速な温度応答性を有するミセルを形成するペプチドはアミノ酸5残基またはアミノ酸10残基のペプチドが適している。より長いペプチド鎖も用いることができるが、そのときには両親媒性の均衡を保つために、より長いオリゴ糖鎖を結合させることが望ましい。例えば、アミノ酸10残基ーアミノ酸40残基のペプチドにはオリゴ糖鎖を結合させ、温度応答的両親媒性糖ペプチドを製造することが可能である。

さらに、本発明にあたっては、ペプチドのN末端は、無保護のアミノ基以外に、アセチル基、Boc基(t-Butyloxycarbonyl)又はFmoc基(9-Fluorenylmethoxycarbonyl)で保護した基であっても良い。

[0014] 本発明にあたって用いられる、エラスチンオリゴペプチド((Val-Pro-Gly-Val-Gly)、(Val-Pro-Gly-X-Gly); Xは任意)はペプチド合成によって簡便に提供される。ペプチド合成は公知である液相合成、固相合成によって簡便に得ることが可能である。

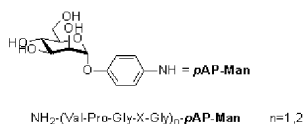
[0015] 本発明の第一の好ましい実施形態は、エラスチンモデルペプチドのオリゴペプチドのシーケンスを有するペプチドに、パラアミドフェノキシドをリンカーとして、単糖であるマンノースを結合した糖ペプチドである。具体的には下記糖ペプチドを挙げることができる。

[0016] [化2]



[0017] 本発明の第二の好ましい実施形態は、エラスチンモデルペプチドのシーケンスを一部変更した糖ペプチドである。エラスチンモデルシーケンスの第4残基を変更したペプチドも温度応答性を示すことがこれまでに報告されているため(J.Phys. Chem. B, 1997, 101, 11007)、一部のシーケンスを変更した化合物についても、温度応答性を示す。具体的には以下の糖ペプチドを挙げることができる。

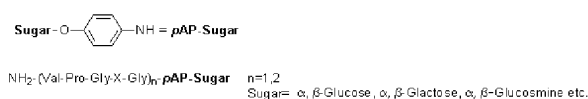
[0018] [化3]



(上式においてXは任意のアミノ酸残基である。)

[0019] 本発明の第三の好ましい実施様態はエラスチンモデルペプチドに結合させる糖部分を種々の糖鎖に変更した糖ペプチドである。

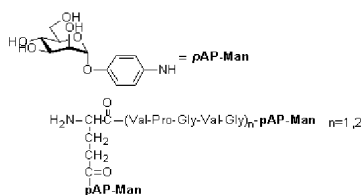
[0020] [化4]



(上式においてXは任意のアミノ酸残基である。)

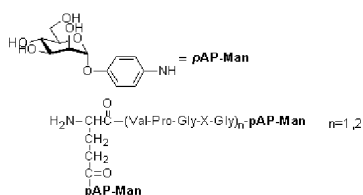
[0021] 本発明の第四の好ましい実施様態は、エラスチンモデルペプチドのC末端に、パラアミドフェノキシドをリンカーとして、マンノースを結合させ、N末端にグルタミン酸の側鎖とパラアミドフェノキシドをリンカーとしてマンノースを結合させた糖ペプチドである。

[0022] [化5]



[0023] 本発明の第五の好ましい実施様態は、エラスチンモデルペプチドの一部を改変し、パラアミドフェノキシドをリンカーとして、C末端にマンノースを結合させ、グルタミン酸の側鎖とパラアミドフェノキシドをリンカーとして、N末端にマンノースを結合させた糖ペプチドである。

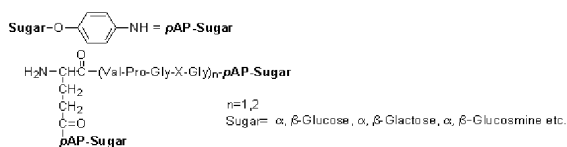
[0024] [化6]



(上式においてXは任意のアミノ酸残基である。)

[0025] 本発明の第六の好ましい実施様態は、エラスチンモデルペプチドの一部を改変し、C、N両末端に任意の糖鎖を結合させたペプチドである。

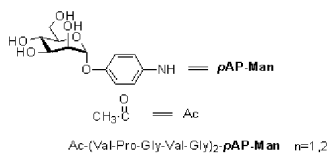
[0026] [化7]



(上式においてXは任意のアミノ酸残基である。)

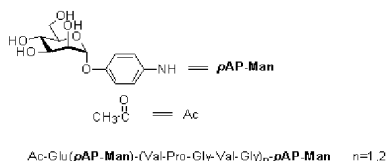
[0027] 本発明の第七の好ましい実施様態は、エラスチンモデルペプチドのN末端を保護して、糖を結合させた以下のペプチドである。

[化8]



[0028] 本発明の第八の好ましい実施様態は、エラスチンモデルペプチドのN末端を保護して、糖を結合させた以下のペプチドである。

[化9]



[0029] ○糖ペプチドの合成方法

(L1がない場合)

先ず、Fmoc法による固相合成によりFmoc-(Val-Pro-Gly-X-Gly)<sub>n</sub>-OHを合成し、次に、公知の方法により糖鎖のアノマー位にリンカーを共有結合させた、リンカー結合型糖鎖を、グリコシル化により、先に合成したオリゴペプチドC末端に共有結合させ、糖鎖結合型オリゴペプチドを得る。その後、ペプチドN末端のFmoc基を脱保護し、逆相シリカゲルクロマトグラフィーで精製し、凍結乾燥することにより目的の糖ペプチドを得る。



(L1がある場合)

グルタミン酸を用いた場合を以下に説明する。

先ず、Fmoc法による固相合成によりFmoc-Glu(Val-Pro-Gly-X-Gly)<sub>n</sub>-OHを合成する。

次に、公知の方法により糖鎖のアノマー位にリンカーを共有結合させた、リンカー結合型糖鎖を、グリコシル化により、先に合成したオリゴペプチドC末端及びグルタミン酸側鎖に共有結合させ、両末端に糖鎖を結合したオリゴペプチドを得る。以降上記と同様の手法により目的の糖ペプチドを得る。

#### [0030] ○温度応答性ミセル

本発明の糖ペプチドにおいて、ペプチドは、温度応答的に凝集した際、温度応答性疎水基として、糖鎖は親水基として各々作用するため、糖ペプチドは、水中で温度応答性ミセルを容易に形成する。

通常、高温になると、ペプチドの疎水性が強くなり、ある水準で飽和する傾向があり、それに伴い、ミセルの粒径は温度とともに大きくなり、ある最大粒径に達する傾向がある。

ペプチドと糖鎖を適宜選択することにより、ミセルの最大粒径を100～10000nmの範囲で制御することができる。

#### 実施例

[0031] 以下に説明する実施例によって、本発明を更に詳細に説明するが、本発明にかかる実施例に限定することを意図したものではない。

[0032] まず、マンノースと各Fmoc化アミノ酸(株式会社ペプチド研究所)を出発原料として、化合物1、化合物4及び化合物8を合成した。

次いで、これらの化合物について、CDスペクトルの測定及び動的光散乱によるミセル形成の測定を行った。化合物1からなるミセルについて、温度応答性を確認する試験を行った。また、気液界面単分子膜を用いた集合性の確認について検討を行った。また、糖認識レクチンである、コンカナバリンAとの結合を蛍光消光実験によって求めた。

以下、合成と測定の方法及びそれらの結果について具体的に説明する。

## [0033] A) ペンタ-O-アセチル D-マンノースの合成

ナスフラスコに無水酢酸(88ml)とピリジン(78ml)をとり、氷浴で0°Cに冷却し、そこへD-マンノース(10.00g, 5.4 mmol)を加え、磁気攪拌した。反応はTLC(展開溶媒、酢酸エチル:ヘキサン=2:1)で追跡した。ピリジンをトルエンとともに共沸騰により、減圧濃縮した。濃縮された目的物を酢酸エチルに溶解し、1N塩酸、飽和NaHCO<sub>3</sub>水、水の順に洗浄した。溶液を無水マグネシウムで乾燥した後、減圧濃縮した。(収率>99%)

## [0034] B) p-ニトロフェニル-テトラ-O-アセチル α-D-マンノシド

二つ口フラスコにモレキュラーシーブ4A(オングストローム)を入れ乾燥させて窒素雰囲気下にした。ペンタ-O-アセチル α-D-マンノシド (10.0 g, 25.6 mmol)とp-ニトロフェノール(10.7 g, 76.86 mmol, 3 eq)をジクロロメタンに溶かしてフラスコ内に注入し、およそ一時間攪拌した。三フッ化ホウ素エーテル錯体(12.8 ml, 4 eq)を加えて終夜攪拌した。反応の進行をTLC(ヘキサン:酢酸エチル=1:1)で追跡した。磁気クロロホルムに希釈し、1N NaOHで3回、水で3回洗浄し、硫酸マグネシウムを入れて攪拌して、28時間後反応を終了した。セライトでモレキュラーシーブをろ過し、溶液を乾燥した。硫酸マグネシウムをろ過した後、トルエンを加えて共沸した黄色固体を酢酸エチルとヘキサンで再結晶して白色結晶を得た。

収量 9.1 g

収率 74.8 %

## [0035] C) p-ニトロフェニル α-D-マンノシド

p-ニトロフェニル-テトラ-O-アセチル α-D-マンノシド (93.9 mg, 0.2 mmol)とナトリウムメキシド (4.7 eq)をメタノール7.1 mlに溶かし、攪拌した。反応の進行をTLC(クロロホルム:メタノール=3:1)で追跡し、一時間後反応を停止した。アンバーリストで中和し、減圧濃縮した。

## [0036] D) p-アミノフェニル α-D-マンノシド

p-ニトロフェニル α-D-マンノシドをメタノールに溶かし、水酸化パラジウム(6 mg)を加えた。フラスコに三方コックをつけ水素風船を取り付けフラスコ内を水素置換した。そのまま攪拌し反応の進行をTLC(クロロホルム:メタノール=3:1)で追跡した。16

時間後反応の終了を確認してパラジウムをろ過した。ろ液を減圧濃縮し、次の反応にそのまま用いた。

[0037] [ペプチド固相合成]

E) 公知のペプチド合成法によって、以下のペプチドを合成した。

ペプチド1 Fmoc-Val-Pro-Gly-Val-Gly-Val-Pro-Gly-Val-Gly

ペプチド2 Fmoc-Val-Pro-Gly-Val-Gly

ペプチド3 Fmoc-Glu-Val-Pro-Gly-Val-Gly-Val-Pro-Gly-Val-Gly

ペプチド4 Fmoc-Glu-Val-Pro-Gly-Val-Gly

ペプチド5 Ac-Val-Pro-Gly-Val-Gly-Val-Pro-Gly-Val-Gly

ペプチド6 Ac-Glu-Val-Pro-Gly-Val-Gly-Val-Pro-Gly-Val-Gly

精製は逆相HPLCカラムによって行い、MALDI-MSスペクトル(アプライドバイオシステム社製、Voyager)によって、合成の確認を行った。

[0038] F) 化合物1 ( $\text{NH}_2$ -Val-Pro-Gly-Val-Gly-Val-Pro-Gly-Val-Gly-pAP-Man) の合成

ペプチド1 (140 mg, 0.13 mmol)を脱水DMFに溶かし、0℃に冷却した。2-(1H-7-アザベンゾトリアゾール-1-イル)-1,1,3,3-テトラメチルウロニウム ヘキサフルオロフォスフェート(HATU) (59.3 mg, 1.2 eq)とジイソプロピルエチルアミン(DIEA) (54  $\mu$ l, 2.4 eq)を加え攪拌した。p-アミノフェニル  $\alpha$ -D-マンノシドのDMF溶液 (1.5 eq)を加え、室温で攪拌した。反応の進行をTLC(クロロホルム:メタノール=1:2)で追跡し、3時間後、HATU 0.5 eqとDIEA 1.0 eqを加えた。一時間後反応を停止し溶媒を減圧濃縮して除いた。LH20ゲルカラム(ファルマシア社製、溶媒メタノール)で精製を行い、Fmoc-Val-Pro-Gly-Val-Gly-Val-Pro-Gly-Val-Gly-pAP-Manを得た。

Fmoc-Val-Pro-Gly-Val-Gly-Val-Pro-Gly-Val-Gly-pAP-ManにピペリジンDMF溶液(20%)を加え、2時間攪拌した。Fmoc保護基が外れたのを確認してから溶媒を減圧濃縮した。メタノールとアセトニトリルから再結晶し遠心分離により固体を収集した。一部をHPLC(0.1%TFA水:メタノール=1:1)でさらに精製し、白色固体(化合物1)を得た。

収量 6.3 mg

収率 4.4 %

純度 98.3 % (HPLC 0.1 %TFA水:メタノール=1:1で分析)

分子量 1113. 6[M+Na]<sup>+</sup>

[0039] G) 化合物4 (NH<sub>2</sub>-Glu(pAP-Man)-Val-Pro-Gly-Val-Gly- Val-Pro-Gly-Val-Gl-pAP-Man) の合成

ペプチド3(140mg, 0.118 mmol)を脱水DMFに溶かし、0℃に冷却した。HATU(107 mg, 1.2 eq)とDIEA (90 μl, 2.4 eq)を加え攪拌した。p-アミノフェニル α-D-マンノシドのDMF溶液 (1.5 eq)を加え、室温で攪拌した。反応の進行をTLC(クロロホルム:メタノール=1:1)で追跡し、24時間後反応を終了した。減圧濃縮してDMFを除き、LH20ゲルカラム(溶媒メタノール)で精製を行った。得られた化合物 Fmoc-NH<sub>2</sub>-Glu(pAP-Man)-Val-Pro-Gly-Val-Gly- Val-Pro-Gly-Val-Gly-pAP-ManにヒペリジンDMF溶液(20%)を加え、30分ほど攪拌した。Fmoc保護基が外れたのを確認してから溶媒を減圧濃縮した。逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー(水:メタノール=1:1)で精製し、凍結乾燥して白色固体を得た。

収量 37 mg

収率 21.3 %

純度 95.1 % (HPLC 0.1 %TFA水:メタノール=1:1で分析)

分子量 1495. 7[M+Na]<sup>+</sup>

[0040] H)化合物8 (Ac-Val-Pro-Gly-Val-Gly-Val-Pro-Gly-Val-Gly-pAP-Man) の合成

ペプチド5(40mg, 0.091 mmol)を脱水ジメチルアセトアミドに溶かし、0℃に冷却した。HATU(26mg, 1.2eq)とDIEA(24 μl, 2.4eq)を加え攪拌した。pAP-マンノシドのDMA溶液(1.5eq)を加え、室温で攪拌した。反応の進行をTLC(クロロホルム:メタノール=2:3)で追跡し、24時間後反応を停止し、溶媒を減圧濃縮して除いた。シリカゲルカラムクロマトグラフィー(溶媒:クロロホルム:メタノール=2:3)、で精製し、残留シリカゲルをLH20カラム(溶媒:メタノール)にて取り除いた。凍結乾燥により、白色固体(化合物8)を得た。

収量 38mg,

収率 73%

純度 97.2% (HPLC 0.1% TFA水:メタノール=1:1で分析)

分子量 1155.3  $[M+Na]^+$

[0041] I) CDスペクトル測定

以上のようにして得られた糖ペプチド(化合物1と4)の温度に伴うコンフォメーションの変化をCDスペクトル(日本分光、J-720)を用いて測定した。 $5 \times 10^{-4}$  (M)の糖ペプチドPBSバッファー溶液を光路長1mmの石英セルを用いて、CDスペクトルの測定を行った。

[0042] 化合物1、化合物4及び化合物8のCDスペクトルを5℃から50℃まで温度を変化させて、CDスペクトルを測定した。CDスペクトルは温度とともに変化して、構造の変化が25℃から30℃付近で起こることが示された。この構造変化は対象ペプチドと同様の温度変化をとり、特に化合物1と8についてはその挙動が類似していることから、ペプチドのコンフォメーション変化はエラスチンモデルペプチドとほぼ同じであることが示された。化合物1(図2、図3)、化合物4(図4、図5)、化合物8(図6、図7)、対照化合物(図8、図9)。

図2、図3: (A) 化合物1のCDスペクトル (B) 220nmの各温度での $[\Theta]$ (但し、 $\Theta$ はMolecular ellipticityを表す。以下同じ。)

図4、図5: (A) 化合物4のCDスペクトル (B) 206nmの各温度での $[\Theta]$

図6、図7: (A) 化合物8のCDスペクトル (B) 220nmの各温度での $[\Theta]$

図8、図9: (A) 対照化合物のCDスペクトル (B) 220nmの各温度での $[\Theta]$

[0043] J) 動的光散乱によるミセル形成の測定

動的光散乱(DLS、大塚電子 HK-6600)によって、糖ペプチドの粒径の測定より、ミセル形成について観察を行った。

[0044] 化合物1、4、8また、対照分子として糖を有していないペプチド( $NH_2$ -Val-Pro-Gly-Val-Gly-Val-Pro-Gly-Val-Gly-OH)を温度を変化させて、溶液中での粒径の測定を行った。化合物1は25℃以上で直径 $2 \mu m$ のミセルを、化合物4は直径400nmのミセルを形成した。それに対して、対照ペプチド分子は非常に粒径の大きな凝集体を形成することがわかった。すなわち、エラスチンモデルペプチド( $NH_2$ -Val-Pro-Gly-Val-Gly-Val-Pro-Gly-Val-Gly-OH)に対して糖を付加させると、高温

で両親媒性となり、一定の粒径のミセルを形成することが示される。(図10)

- [0045] N末端に保護基を付加させた、化合物8では集合体を形成する温度が35℃以上へと変化し、N末端の保護によって、集合体の形成温度をコントロールできることが示された。
- [0046] ポリN-イソプロピルアクリルアミドなどの温度応答性高分子、エラスチンモデルペプチドの多量体からなる温度応答性の高分子は巨大分子であるため、温度応答性に対する時間的なレスポンスの遅れ(通常、数時間〜24時間)が観測される。それに対して、本発明の糖ペプチドはオングストロームレベルの小分子からなるため、早い応答性を有しており、しかもその応答性は繰り返しても保たれる。
- [0047] 化合物1の溶液について、15℃と35℃の間の温度領域を15分間で温度変化させ、その温度変化を繰り返し、15℃と35℃における粒径測定を行った。化合物1からなるミセルは、昇温により粒径が増大し、降温により粒径が減少するというサイクルを繰り返し、少なくとも5回のほぼ完全なミセル形成が観測されることがわかった。(図5)
- [0048] K) 気液界面単分子膜形成による、分子集合性の測定
- LB膜作成装置(日本レーザー電子株式会社)によって、糖ペプチドの気液界面での集合性について解析を行った。
- [0049] 化合物1、また、対照分子として糖を有していないペプチド( $\text{NH}_2$ -Val-Pro-Gly-Val-Gly-Val-Pro-Gly-Val-Gly-OH)を用いた。これらペプチドを蒸留したクロロホルムに溶解させ、溶液濃度20  $\mu\text{l}$ とした。この化合物をハミルトンガスタイトシリンジによって、気液界面に播種した。10分静置したのち、 $\pi$ -A曲線の測定を行った。分子の温度応答的な疎水性部分の変化によって、気液界面の単分子膜の挙動が変化した。温度が、5, 10から25℃程度に上昇させるにつれ、ペプチド部分が疎水性に変化するため、分子間の相互作用が変化して、膜は膨張した。さらに、温度を上昇させると、膜は凝集して、小さな分子占有面積をとるようになった。(図12)
- [0050] 化合物1について、温度が上昇した、45度の $\pi$ -A曲線は、分子占有面積が小さくなり、分子の $\pi$ -A曲線のカーブも急峻に変化した。高温でのペプチドが両親媒性へと変化するため、糖ペプチド分子の配向が界面に垂直に近い状態へと変化していることが示された。(図12)

## 産業上の利用可能性

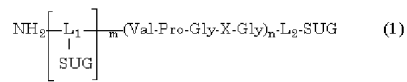
[0051] 本発明の温度応答性糖ペプチドは可逆的かつ、迅速な温度応答性を有し、ミセルを形成する。また、オングストロームレベルの温度応答性分子であるため、精密な応答性を要するドラッグデリバリーシステム(DDS)やその他の分子デバイスに用いられる。

具体的には、生体に投与された薬物を必要な組織に必要な時に必要な量だけ送達し、有効な薬物治療を行うドラッグデリバリーシステムに本糖ペプチドを利用した場合、本糖ペプチドはその迅速な温度応答性のため、生体の体温や皮膚温、もしくは生体外部からの温度刺激に対して迅速に反応してミセル内包薬物を放出させるなど、医学的・薬学的にも、或いは化粧料の分野においても、応用価値の高いものである。また、糖鎖は細胞、病原菌、毒素、ウイルスと特異的な相互作用をするため、ミセルを形成させた本糖ペプチドは臓器特異的、あるいは病原菌や毒素特異的にも薬剤を送達することができると考えられる。従って、本糖ペプチドは、放出制御型かつ標的指向型と両者性質を兼ね備えたDDSに利用できるため、産業上非常に有用であるといえる。また、本糖ペプチドを修飾糖鎖として利用することもできる。例えば、タンパク質の翻訳後修飾の一つである糖鎖修飾の過程において、本糖ペプチドの糖鎖を利用し目的のタンパク質に本糖ペプチドを結合させた場合、該タンパク質の構造を温度応答的に変化させることが可能である。従って、本糖ペプチドは温度応答的に酵素を含めタンパク質の失活あるいは活性の向上を制御することも可能であり、医薬的にも非常に興味深いものである。

## 請求の範囲

- [1] 天然には存在しない合成された糖ペプチドであって、下式(1)で表される糖ペプチド。

[化1]

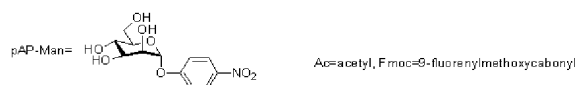
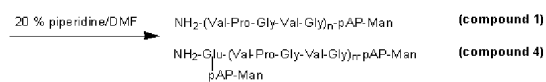
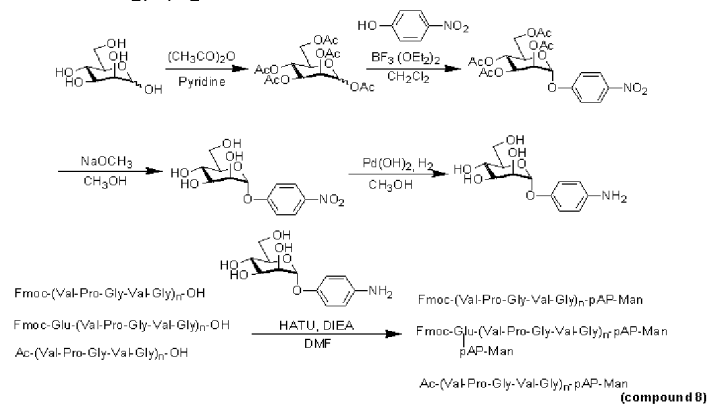


(上式においてXは任意のアミノ酸残基であり、 $\text{L}_1$  及び  $\text{L}_2$  はリンカーであり、SUGは糖鎖であり、mは0又は1であり、nは1〜10の整数であり、 $\text{L}_1$  及び  $\text{L}_2$  は互いに同じであっても異なってもよく、複数のSUGは互いに同じであっても異なっても良い。)

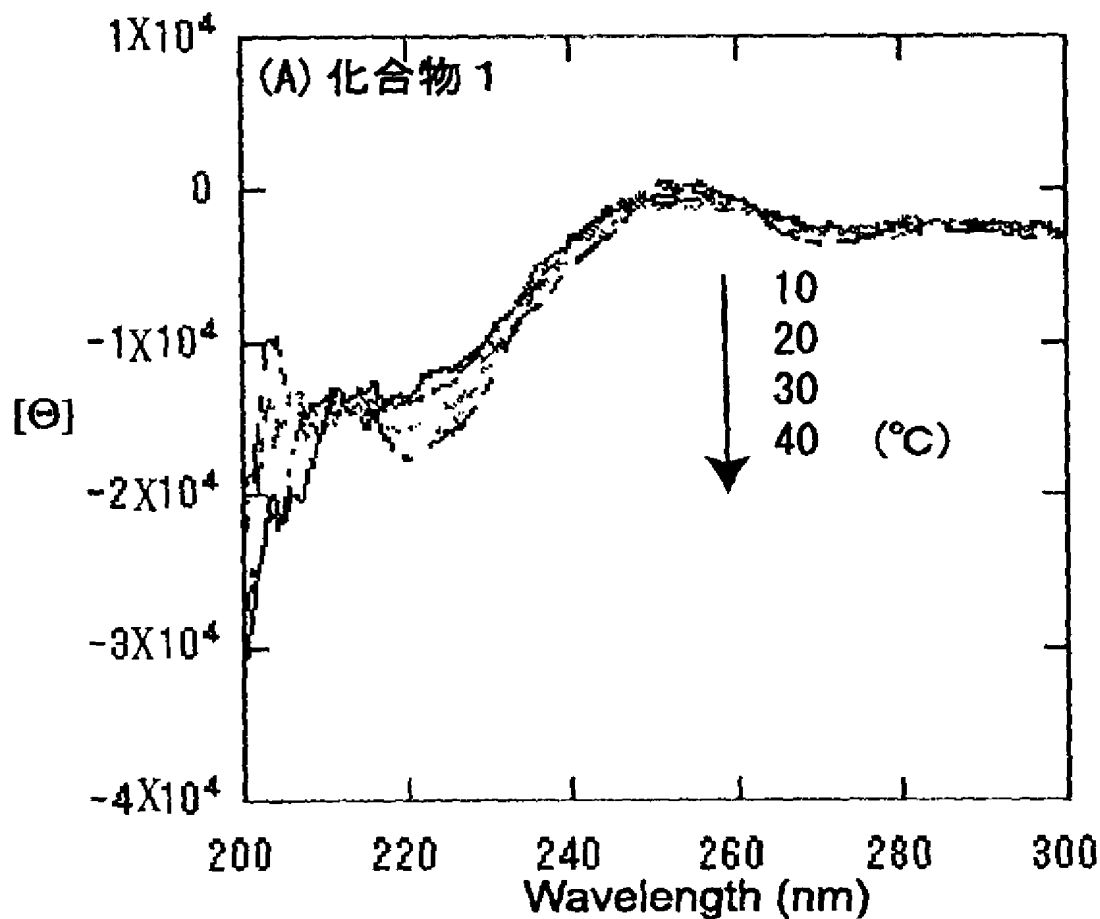
- [2] 上式(1)におけるSUGが単糖又はオリゴ糖の糖鎖である請求項1記載の糖ペプチド。
- [3] 上式(1)におけるXが、Valである請求項1又は請求項2記載の糖ペプチド。
- [4] 上式(1)におけるmが0である請求項1〜請求項3の何れかに記載の糖ペプチド。
- [5] 請求項1〜請求項4の何れかに記載の糖ペプチドからなる温度応答性ミセル。



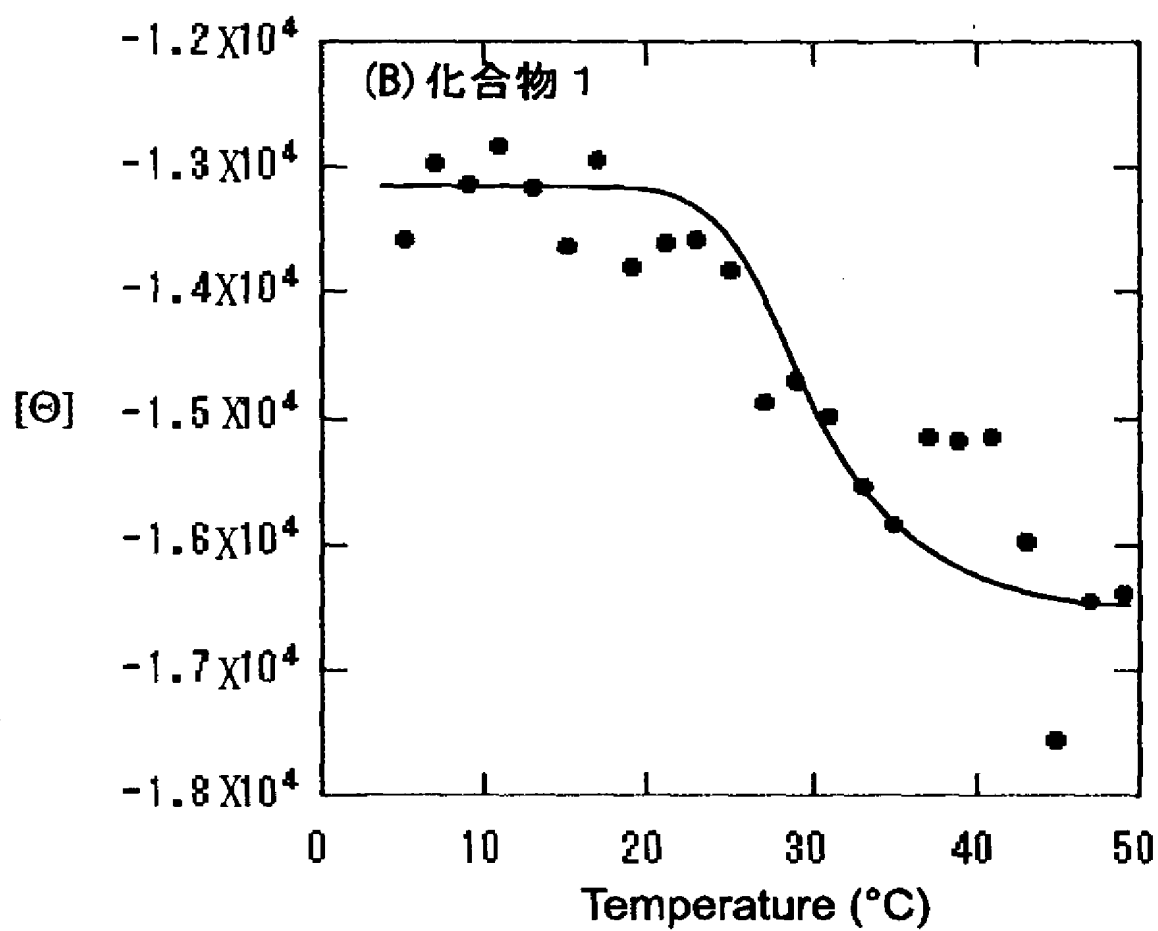
[図1]



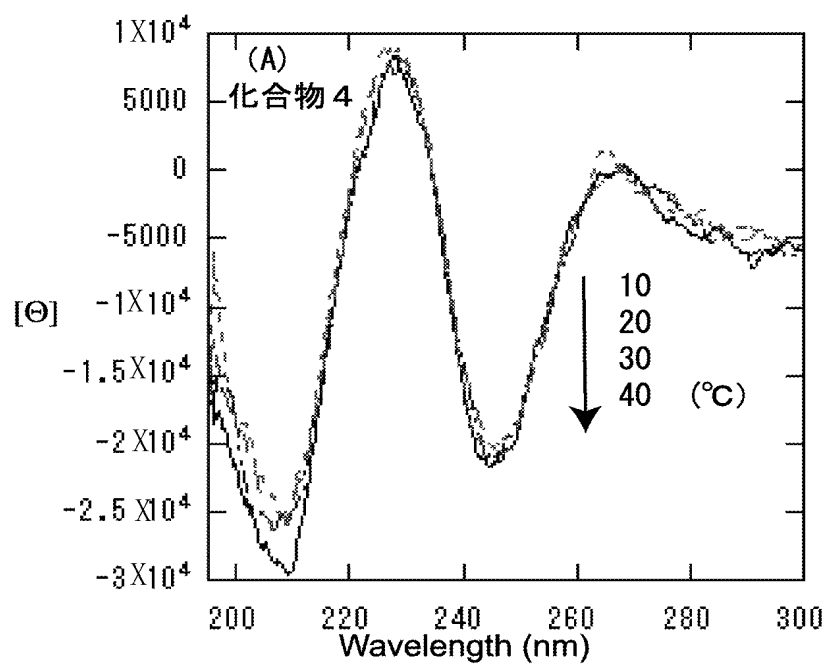
[図2]



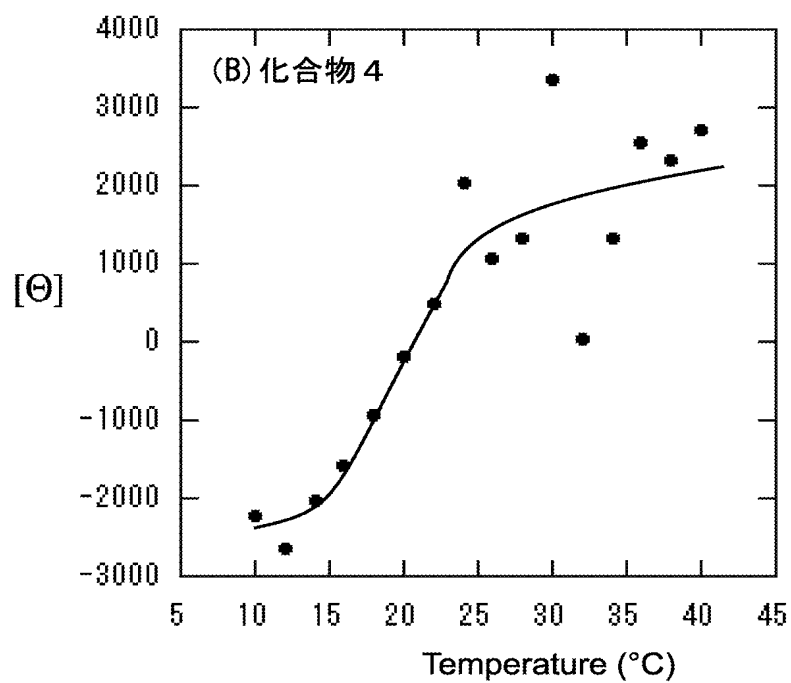
[図3]



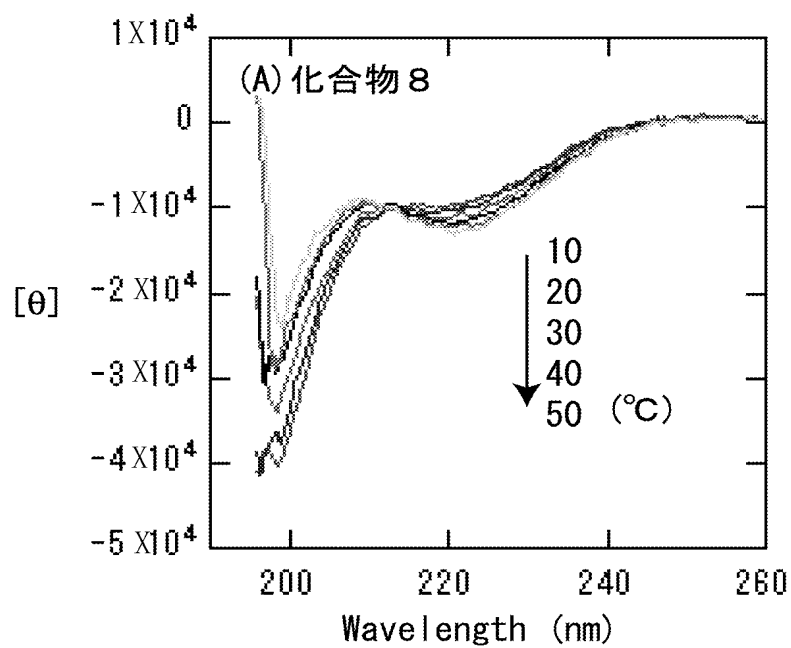
[図4]



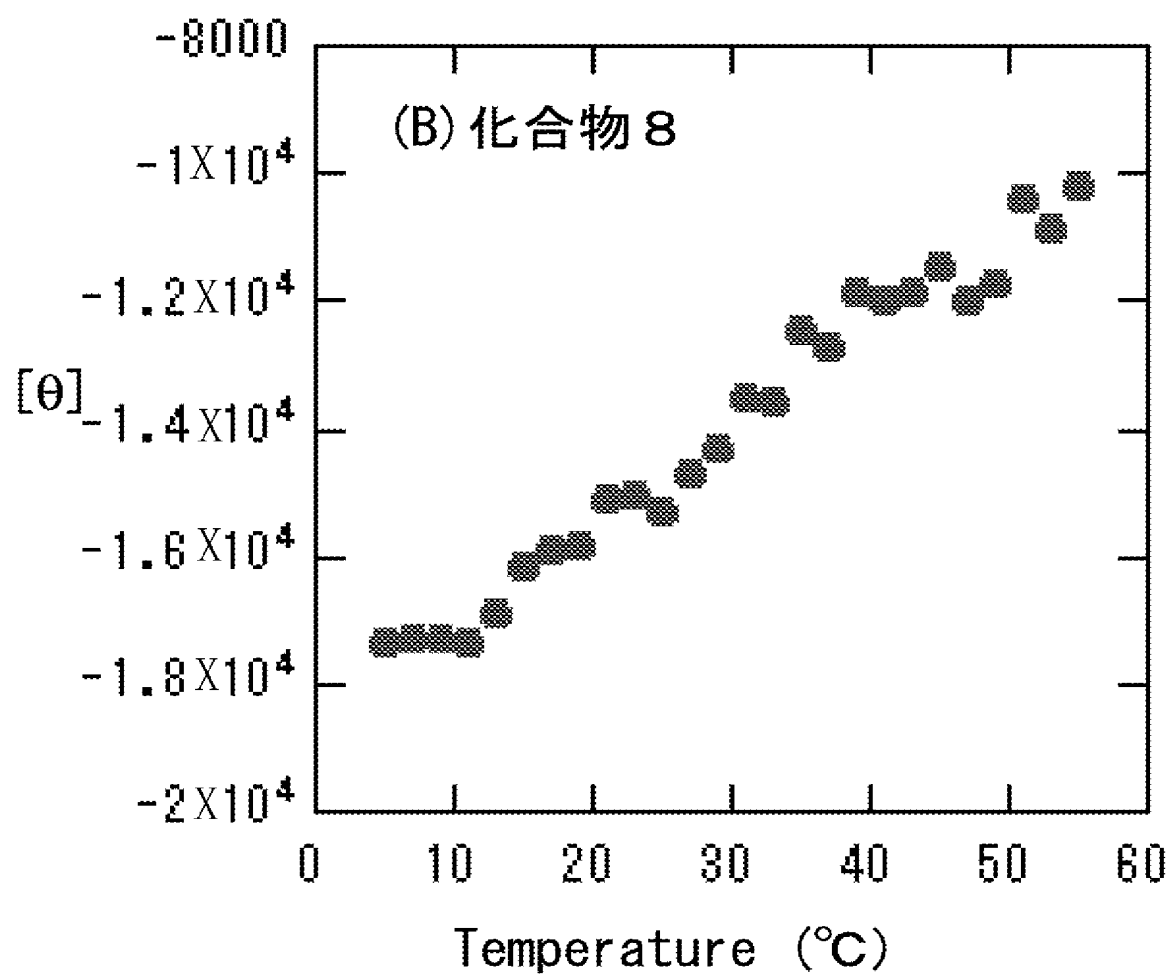
[図5]



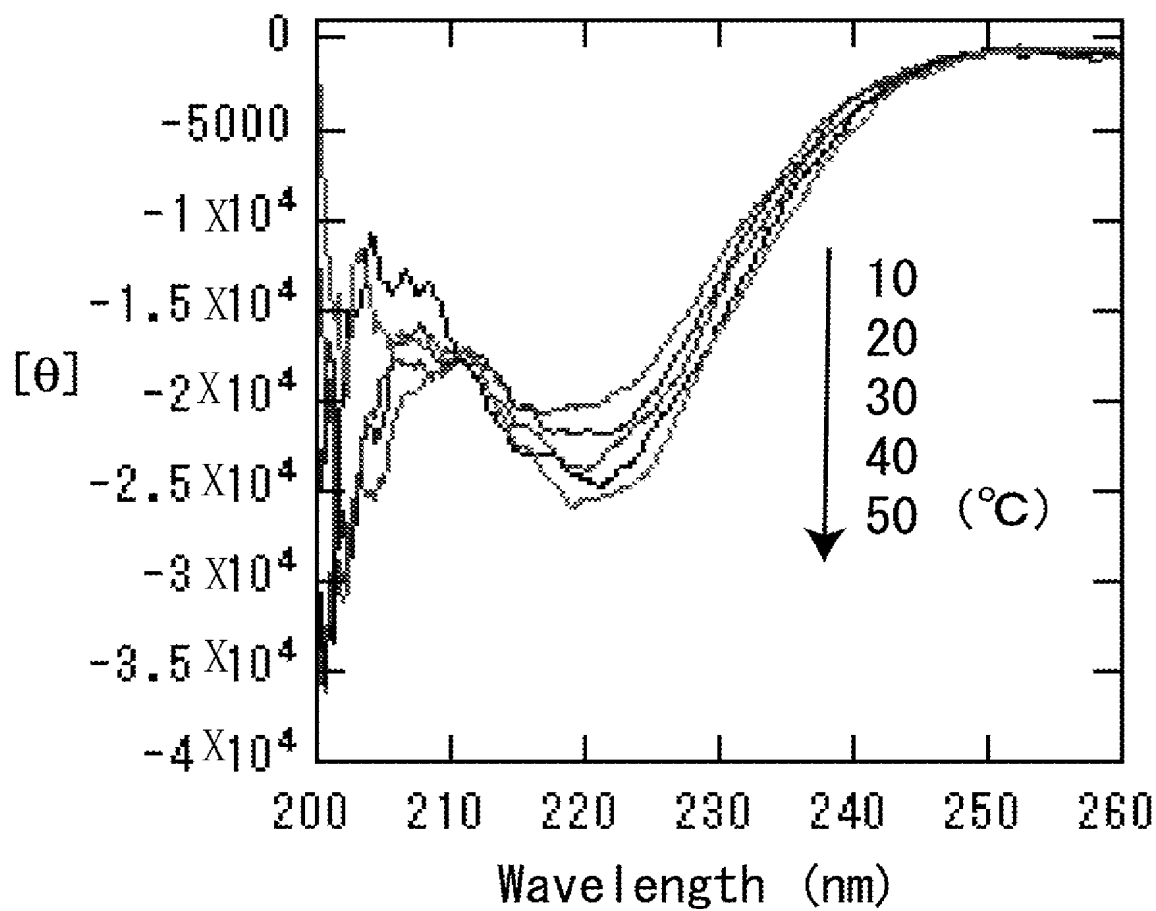
[図6]



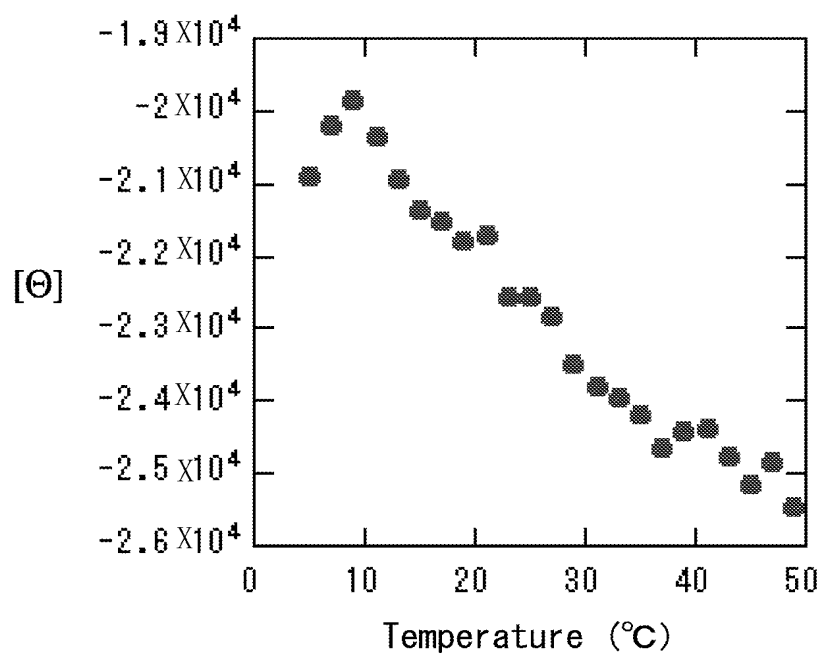
[図7]



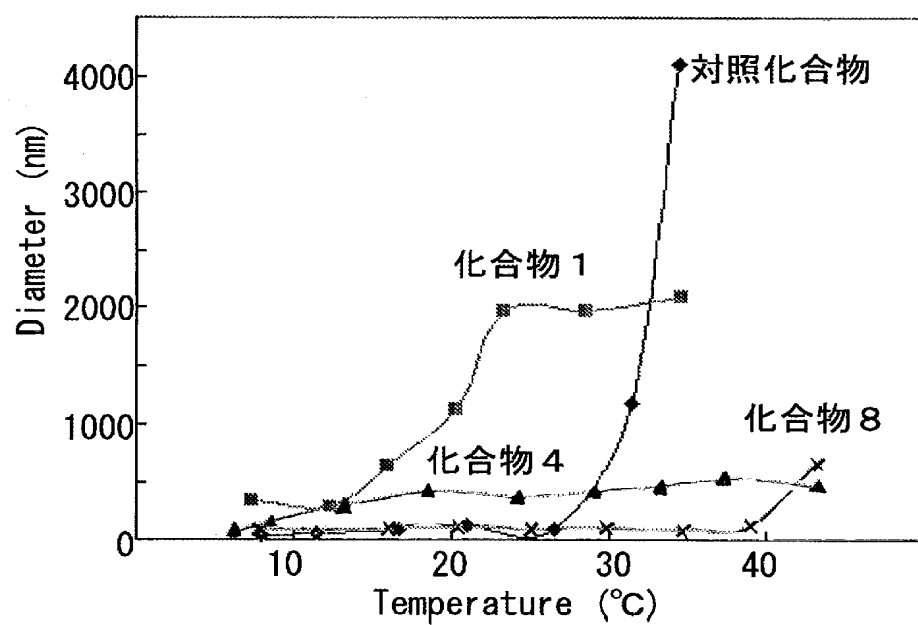
[図8]



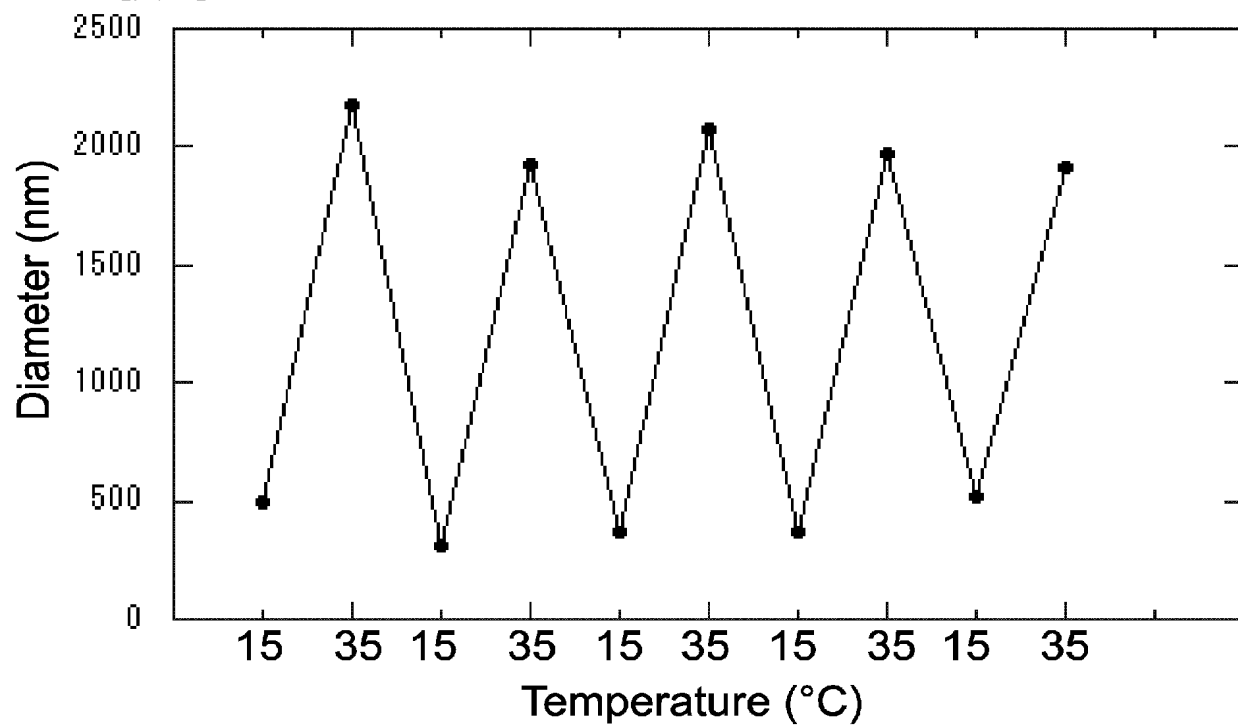
[図9]



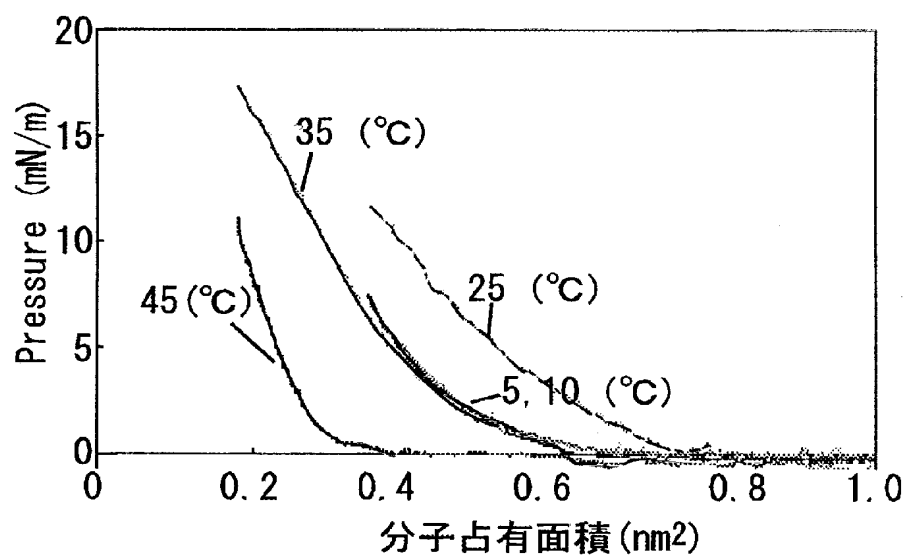
[図10]



[図11]



[図12]



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/007246

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
Int.Cl<sup>7</sup> C07K7/06, A61K47/42

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
Int.Cl<sup>7</sup> C07K7/06, A61K47/42

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
CA (STN), REGISTRY (STN), WPIDS (STN), JSTPlus (JOIS)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X, Y	Chieri SHIBATA et al., "Ondo Otosei To-peptide no Soyaku to Kino Kaiseki", Polymer Preprints, Japan, 08 May, 2003 (08.05.03), 52(5), 1066	1-5
X, Y	Yoshiko MIURA et al., "Ondo Otosei To-peptide no Gosei to Kino Kaiseki", Polymer Preprints, Japan, 10 September, 2003 (10.09.03), 52(13), 3771-3772	1-5
Y	Urry, Dan W., "Physical Chemistry of Biological Free Energy Transduction as Demonstrated by Elastic Protein-Based Polymers, Journal of Physical Chemistry B (1997), 101(51), 11007-11028	1-5

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
14 June, 2004 (14.06.04)

Date of mailing of the international search report  
06 July, 2004 (06.07.04)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/007246

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	McMillan, R. Andrew; Caran, Kevin L.; Apkarian, Robert P.; Conticello, Vincent P., "High-Resolution Topographic Imaging of Environmentally Responsive, Elastin-Mimetic Hydrogels", Macromolecules(1999), 32(26), 9067-9070	1-5
A	Van Hest, Jan C.M.; Ayres, Lee; Spijker, Henri; Vos, Matthijn; Opsteen, Joost, "Bioinspired triblock copolymers prepared by atom transfer radical copolymerization", ACS Symposium Series (2003), 854(Advances in Controlled/Living Radical Polymerization), 394-410	1-5
A	St.Hilaire, Phaedria M.; Lowary, Todd L.; Meldal, Morten; Bock, Klaus, "Oligosaccharide Mimetics Obtained by Novel, Rapid Screening of Carboxylic Acid Encoded Glycopeptide Libraries", Journal of the American Chemical Society(1998), 120(51), 13312-13320	1-5

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))			
Int cl7 C07K7/06, A61K47/42			
B. 調査を行った分野			
調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))			
Int cl7 C07K7/06, A61K47/42			
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの			
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)			
CA (STN), REGISTRY (STN), WPIDS (STN) JSTPlus (JOIS)			
C. 関連すると認められる文献			
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号	
X、Y	柴田千絵里他、温度応答性糖ペプチドの創製と機能解析、高分子学会予稿集, (2003-5-8), 52(5), 1066	1-5	
X、Y	三浦佳子他、温度応答性糖ペプチドの合成と機能解析、高分子学会予稿集, (2003-9-10), 52(13), 3771-3772	1-5	
Y	Urry, Dan W., Physical Chemistry of Biological Free Energy Transduction As Demonstrated by Elastic Protein-Based Polymers, Journal of Physical Chemistry B (1997), 101(51), 11007-11028	1-5	
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。			
* 引用文献のカテゴリー		の日の後に公表された文献	
「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの		「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの	
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの		「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの	
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)		「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの	
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献		「&」 同一パテントファミリー文献	
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願			
国際調査を完了した日 14.06.2004		国際調査報告の発送日 06.7.2004	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 内藤 伸一	4B 8615
		電話番号 03-3581-1101 内線 3448	

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	McMillan, R. Andrew; Caran, Kevin L.; Apkarian, Robert P.; Conticello, Vincent P. High-Resolution Topographic Imaging of Environmentally Responsive, Elastin-Mimetic Hydrogels, <i>Macromolecules</i> (1999), 32(26), 9067-9070	1-5
A	van Hest, Jan C. M.; Ayres, Lee; Spijker, Henri; Vos, Matthijn; Opsteen, Joost, Bioinspired triblock copolymers prepared by atom transfer radical copolymerization, <i>ACS Symposium Series</i> (2003), 854(Advances in Controlled/Living Radical Polymerization), 394-410	1-5
A	St. Hilaire, Phaedria M.; Lowary, Todd L.; Meldal, Morten; Bock, Klaus, Oligosaccharide Mimetics Obtained by Novel, Rapid Screening of Carboxylic Acid Encoded Glycopeptide Libraries, <i>Journal of the American Chemical Society</i> (1998), 120(51), 13312-13320	1-5